

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA LESARSTVO

Jože KOSEM

**LOČBA LIGNANOV JELKE (*Abies alba*)  
S TANKOPLASTNO KROMATOGRAFIJO**

DIPLOMSKI PROJEKT  
Visokošolski strokovni študij – 1. stopnja

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA LESARSTVO

Jože KOSEM

**LOČBA LIGNANOV JELKE (*Abies alba*)  
S TANKOPLASTNO KROMATOGRAFIJO**

DIPLOMSKI PROJEKT  
Visokošolski strokovni študij – 1. stopnja

**SEPARATION OF SIMPLE FIR LIGNANS (*Abies alba*) BY THIN  
LAYER CHROMATOGRAPHY**

B. SC. THESIS  
Professional Study Programmes

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek Visokošolskega študija Tehnologije lesa in vlaknatih kompozitov. Opravljeno je bilo v delovni skupini za kemijo lesa Oddelka za lesarstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Poizkus je bil izveden v laboratoriju za kemijo lesa.

Senat Oddelka za lesarstvo je za mentorico diplomskega dela imenoval doc. dr. Ido Poljanšek, za somentorja je bil imenovan prof. dr. Primož Oven, za recenzenta pa je bil imenovan prof. dr. Marko Petrič.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Jože Kosem

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

ŠD Dv1  
DK UDK 630\*813  
KG navadna jelka/*Abies alba*/grče/Soxhlet/TLC/lignani  
AV KOSEM, Jože  
SA POLJANŠEK, Ida (mentorica)/OVEN, Primož (somentor)/PETRIČ, Marko (recenzent)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Rožna dolina, c. VIII/34  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo  
LI 2012  
IN LOČBA LIGNANOV JELKE (*Abies alba*)  
S TANKOPLASTNO KROMATOGRAFIJO  
TD Diplomski projekt (Visokošolski strokovni študij – 1. stopnja)  
OP VII, 34 str., 8 pregl., 21 sl., 9 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Raziskovali smo primeren sistem topil za ločbo lignanov jelke s tankoplastno kromatografijo. Vzorcem grč jelke smo določili delež suhe snovi. S Soxhletovo ekstrakcijo smo ekstrahirali vzorce jelke. Prva ekstrakcija je bila s cikloheksanom, druga pa z mešanico acetona in vode v razmerju 95:5. Iz dobljenih ekstraktov smo določili delež suhe snovi v ekstraktu. Opravili smo tudi ekstrakcijo z acetonom, brez predhodne ekstrakcije s cikloheksanom. Dobljene vzorce ekstraktov smo nato nanašali na TLC plošče in jih razvijali v mobilni fazi, za kar smo uporabili diklorometan in etanol v volumskem razmerju 93:7. Za vizualizacijo lis smo uporabili reagent  $H_2SO_4$  / etanol v volumskem razmerju 50:50. Lisam na kromatogramu smo določili zadrževalni faktor. Na osnovi primerjave naših rezultatov s podatki iz literature smo določili tudi nekatere organske snovi, ki so bile v ekstraktu grč jelke.

**KEY WORDS DOKUMENTATION**

DN Dv1  
DC UDC 630\*813  
CX simple fir/*Abies alba*/knots/Soxhlet/TLC/lignans  
AU KOSEM, Jože  
AA POLJANŠEK, Ida (supervisor)/OVEN, Primož (co-supervisor)/PETRIČ, Marko (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Rožna dolina, c. VIII/34  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Wood Science and Technology  
PY 2012  
TI SEPARATION OF SIMPLE FIR LIGNANS (*Abies alba*)  
BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY  
DT B. Sc. Thesis (Professional Study Programmes)  
NO VII, 34 p., 8 tab., 21 fig., 9 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB The main task was to determine a solvent system for the separation of fir lignans by thin layer chromatography. The dry substance of in fir samples was determined. We used Soxhlet method device firstly to extract hydrophobic (lipophilic) components with cyclohexane, and then to extract hydrophilic components with a mixture of water and acetone, the ratio of 95:5. Obtained from extracts, we determined the proportion of dry matter in the extract. We also carried out extraction with acetone without prior extraction with cyclohexane. The resulting sample extracts were then related to the TLC plate and developed in the mobile phase. Dichloromethane to ethanol volume ratio of 93:7 was used for the mobile phase, and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / ethanol reagent volume ratio of 50:50 for spots visualization. The retention factor was determined from the spots on the chromatogram. Based on a comparison of our results with data from the literature, some organic substances which were in the extracts of knots were also determined.

**KAZALO VSEBINE**

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>II</b>
<b>KEY WORDS DOKUMENTATION .....</b>	<b>III</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VI</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VII</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA .....	1
1.2 CILJI NALOGE .....	1
1.3 DELOVNE HIPOTEZE .....	1
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>2</b>
2.1 NAVADNA JELKA.....	2
<b>2.1.1 Opis lesa jelke .....</b>	<b>3</b>
2.2 EKSTRAKTIVNE SNOVI .....	4
<b>2.2.1 Ekstraktivne snovi, topne v nepolarnih topilih.....</b>	<b>4</b>
<b>2.2.2 Ekstraktivne snovi, topne v polarnih topilih.....</b>	<b>4</b>
2.3 EKSTRAKCIJA .....	5
<b>2.3.1 Soxhletova ekstrakcija .....</b>	<b>5</b>
2.4 TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA.....	6
<b>2.4.1 Ločba lignanov jelke s TLC.....</b>	<b>7</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>9</b>
3.1 MATERIALI .....	9
<b>3.1.1 Vzorci lesa .....</b>	<b>9</b>
<b>3.1.2 Kemikalije .....</b>	<b>9</b>
3.2 METODE .....	10
<b>3.2.1 Določanje suhe snovi .....</b>	<b>10</b>
3.2.1.1 Suhi ostanek.....	10
<b>3.2.2 Soxhletova ekstrakcija lesa jelke.....</b>	<b>10</b>
<b>3.2.3 Tankoplastna kromatografija ekstraktov jelke .....</b>	<b>12</b>

<b>3.2.4 Izračuni.....</b>	<b>14</b>
<b>4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....</b>	<b>15</b>
4.1 SUHA SNOV .....	15
4.2 DELEŽ EKSTRAHIRANIH SNOVI V CIKLOHEKSANU.....	16
4.3 DELEŽ EKSTRAHIRANIH SNOVI V ACETONU.....	17
4.4 ANALIZA EKSTRAKTIVOV JELKE S TANKOPLASTNO KROMATOGRAFIJO .....	18
<b>4.4.1 Tankoplastna kromatografija cikloheksanskih ekstraktov.....</b>	<b>20</b>
<b>4.4.2 Tankoplastna kromatografija acetonskih ekstraktov .....</b>	<b>22</b>
4.4.2.1 Tankoplastna kromatografija acetonskih ekstraktov brez predhodne cikloheksanske ekstrakcije.....	27
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>29</b>
5.1 RAZPRAVA.....	29
<b>5.1.1 Suha snov.....</b>	<b>29</b>
<b>5.1.2 Delež ekstrahiranih snovi v cikloheksanu .....</b>	<b>29</b>
<b>5.1.3 Delež ekstrahiranih snovi v acetonu .....</b>	<b>29</b>
<b>5.1.4 TLC .....</b>	<b>30</b>
5.1.4.1 TLC s cikloheksanskim ekstraktom .....	30
5.1.4.2 TLC z acetonskim ekstraktom .....	30
<b>6 SKLEP .....</b>	<b>31</b>
<b>7 POVZETEK.....</b>	<b>32</b>
<b>8 VIRI .....</b>	<b>34</b>
<b>ZAHVALA</b>	

**KAZALO PREGLEDNIC**

Preglednica 1: Seznam uporabljenih kemikalij, ki smo jih uporabljali za naš poizkus.....	9
Preglednica 2: Zadrževalni faktorji pridobljeni iz cikloheksanskega ekstrakta .....	20
Preglednica 3: Zadrževalni faktorji pridobljeni iz acetonskega ekstrakta. Legenda: HMR + allo – HMR: hidroksimatairezinol + allo –hidroksimatairezinol, Lari: laricirezinol, Seco: secoizolaricirezinol, Todo: todolaktol, Lignan A: lignan A, Oligolignans: oligolignani. ....	23
Preglednica 4: Zadrževalni faktorji pridobljeni iz acetonskega ekstrakta . Legenda: HMR + allo – HMR: hidroksimatairezinol + allo –hidroksimatairezinol, Lari: laricirezinol, Seco: secoizolaricirezinol, Todo: todolaktol, Lignan A: lignan A, Oligolignans: oligolignani. ....	24
Preglednica 5: Zadrževalni faktorji pridobljeni iz acetonskega ekstrakta. Legenda: Lari: laricirezinol, Seco: secoizolaricirezinol, Todo: todolaktol, Lignan A: lignan A, Oligolignans: oligolignani. ....	25
Preglednica 6: Zadrževalni faktorji pridobljeni iz acetonskega ekstrakta. Legenda: HMR + allo – HMR: hidroksimatairezinol + allo –hidroksimatairezinol, Lari: laricirezinol, Seco: secoizolaricirezinol, Todo: todolaktol, Lignan A: lignan A, Oligolignans: oligolignani. ....	26
Preglednica 7: Zadrževalni faktorji pridobljeni iz acetonskega ekstrakta, brez predhodne ekstrakcije v cikloheksanu. Legenda: Pino + MR: pinorezinol + matairezinol, HMR + allo – HMR: hidroksimatairezinol + allo – hidroksimatairezinol, Lari: laricirezinol, Me – Seco: Me – secoizolaricirezinol, Seco: secoizolaricirezinol, Todo: todolaktol, Lignan A: lignan A, Oligolignans: oligolignani. ....	27
Preglednica 8: Zadrževalni faktorji pridobljeni iz acetonskega ekstrakta , brez predhodne ekstrakcije v cikloheksanu. Legenda: Pino + MR: pinorezinol + matairezinol, HMR + allo – HMR: hidroksimatairezinol + allo – hidroksimatairezinol, Lari: laricirezinol, Me – Seco: Me – secoizolaricirezinol, Seco: secoizolaricirezinol, Todo: todolaktol, Lignan A: lignan A, Oligolignans: oligolignani. ....	28

## KAZALO SLIK

Slika 1: Soxhletov ekstraktor.....	5
Slika 2: Skica plošče TLC s prikazom kje se nanese vzorec, do kam potuje mobilna faza, kje nastajajo lise na kromatogramu .....	7
Slika 3: Kromatogram jelke in smreke .....	7
Slika 4: Shema organskih spojin, ki jih vsebuje les jelke.....	8
Slika 5: Sestavljanje Soxhletovega aparata .....	11
Slika 6: Nanašanje ekstrakta s stekleno kapilaro.....	12
Slika 7: Kromatografska kad.....	13
Slika 8: Nanašanje reagenta za vizualizacijo na kromatografsko ploščo .....	13
Slika 9: Grafični prikaz povprečne vrednosti suhe snovi .....	15
Slika 10: Grafični prikaz povprečnih deležev ekstraktivov v cikloheksanu. ....	16
Slika 11: Grafični prikaz povprečnih deleža ekstraktivov v acetonus .....	17
Slika 12: Primerjava kromatograma jelke iz članka z našim kromatogramom. Legenda: Pino + MR: pinorezinol + matairezinol, HMR + allo – HMR: hidroksimatairezinol + allo – hidroksimatairezinol, Lari: laricirezinol, Me – Seco: Me – secoizolaricirezinol, Seco: secoizolaricirezinol, Todo: todolaktol, Lignan A: lignan A, Oligolignans: oligolignani.....	18
Slika 13: Primerjava kromatograma smreke iz članka z našim kromatogramom. Legenda: Coni + MR: + matairezinol, HMR: hidroksimatairezinol, allo-HMR: allo- hidroksimatairezinol, Seco: secoizolaricirezinol, Todo: todolaktol, Lignan A: lignan A, Oligolignans: oligolignani .....	19
Slika 14: Kromatogram opravljen s cikloheksanskim ekstraktom za vzorce od 1 do 12 grča. .....	20
Slika 15: Kromatogram opravljen s cikloheksanskim ekstraktom za vzorce od 13 do 24 grča. ....	21
Slika 16: Kromatogram opravljen s cikloheksanskim ekstraktom za vzorce od 25 do 30 grča in 1 do 6 les.....	21
Slika 17: Kromatogram pridobljen z acetonskim ekstraktom za vzorce od 1 do 8 grča. ....	23
Slika 18: Kromatogram pridobljen z acetonskim ekstraktom za vzorce od 9 do 16 grča. .	24
Slika 19: Kromatogram pridobljen z acetonskim ekstraktom za vzorce od 17 do 24 grča.25	
Slika 20: Kromatogram pridobljen z acetonskim ekstraktom za vzorce od 25 do 30 grča.26	
Slika 21: Kromatogram pridobljen z acetonskim ekstraktom, brez predhodne ekstrakcije v cikloheksanu. ....	28

## 1 UVOD

### 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Jelka je v Sloveniji med ekonomsko bolj pomembnimi drevesnimi vrstami. Jelovina je relativno dobro raziskana na mikroskopskem in makroskopskem nivoju, dobro so poznane tudi sušilnične lastnosti ter fizikalne in mehanske lastnosti. Relativno skromni pa so podatki o kemijski sestavi lesa jelke. Še zlasti slabo so raziskani ekstraktivi. V diplomski nalogi smo zato s tankoplastno kromatografijo raziskovali ekstrakte lesa jelke.

### 1.2 CILJI NALOGE

Cilji naloge so:

- določitev primerne mobilne faze za kvalitativno določitev in ločitev nekaterih fenolnih spojin, ki se redno pojavljajo v ekstraktih lesa in skorji različnih drevesnih vrst,
- določitev spojin s primerjavo naših rezultatov s podatki iz literature.

### 1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Predvidevamo, da bomo z ustrezno mešanico topil ločili posamezne lignane, ki nastopajo kot ekstraktivi lesa jelke. Poleg tega pa pričakujemo, da bo  $H_2SO_4$ /etanol pravilen reagent za vizualizacijo komponent, ki se nahajajo v ekstraktih.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 NAVADNA JELKA

Opis jelke je povzet po Mlakar (1985). Jelka je 40 m do 60 m visoko drevo, debelo do 2 m. Krošnja jelke je v mladosti stožčasta, pri starejših drevesih valjasta ali jajčasta. Koreninski sistem jelke je srednje globok, pogosto z izrazito srčno korenino. Deblo je ravno, enakomerno razvito do vrha. Skorja jelke je tanka, sive barve s smolnimi mešički, pri mlajših osebkih gladka, pri starejših razpoka v okrogle luske. Veje jelke izraščajo vodoravno iz debla, v zgornjem delu krošnje so nekoliko obrnjene navzgor, v spodnjem pa nekoliko navzdol. Iglice jelke so ploščate, dolge 15 mm do 30 mm in 2 mm do 2,5 mm široke. V zgornjem delu krošnje so krajše, debelejše in svetlejše s koničastim vrhom. V spodnjem delu pa daljše, tanjše, temnejše in na vrhu zaobljene. Iglice jelke so po vejah razporejene v dveh vrstah. Jelka cveti od aprila do junija, ima moške cvetove, ki so dolgi do 2 cm, rumeni, s premenjalnimi prašniki. Ženski cvetovi jelke so 2 cm velikih jajčastih, storžastih socvetij, temnozelene barve. Storži jelke so zreli septembra. Oktobra, ko storži razpadajo, se semena jelke razsejejo. Storži so dolgi do 15 cm in debeli do 5 cm. Seme je veliko do 9 mm, bleščeče rjave barve. V mladosti jelka raste zelo počasi. Če jelka raste v senci večjih dreves ali na višje ležečih krajinah, rast pospeši po 15 letih starosti ali kasneje. Jelka doživi starost do 500 let.

### 2.1.1 Opis lesa jelke

Povzeto po Čufar (2006). Pri jelki se beljava ter jedrovina barvno ne ločita. Les jelke ima rahel rumenkast odtenek. Kjer ima jelka mokro srce, pa se les rahlo obarva. Branike so dobro vidne, smolnih kanalov nima, zato ni izrazitega vonja po smoli. Mokro srce ima neprijeten kiselkast vonj. Jelka se le malo razlikuje od smreke, saj se les loči samo po smolnih kanalih. Jelka ima trše ter močnejše grče kot smreka. Jelovina ima boljše stabilnostne lastnosti od smrekovine, saj se manj krči, jelovina je tudi bolj elastična ter upogibljiva. Jelovina ima dobro odpornost proti kislinam, zato je primerna za embalažo, kjer so prisotne kemijske snovi. Mizarji jelovine za obdelovanje nimajo radi, ker se rada zvija ter poka.

## 2.2 EKSTRAKTIVNE SNOVI

Povzeto po Tišler (1986). Les je sestavljen iz celuloze, lesnih polioz in lignina. To so glavne sestavine celične stene. Les vsebuje še večje ali manjše količine drugih snovi, med njimi tudi ekstraktivne sestavine. Mnogo ekstraktivnih snovi lahko ekstrahiramo z nevtralnimi topili, kot so eter, alkohol in voda. Ekstraktivne snovi so različne kemijske spojine. Posamezna vrsta ne vsebuje vseh možnih spojin. Ekstraktivne snovi sorodnih drevesnih vrst so si podobne. V deblu drevesa najdemo manj ekstraktivnih snovi kakor pa v vejah drevesa. V beljavci najdemo sladkorje in snovi, ki so topne v rastlinskem soku. Fenolne snovi so ponavadi v jedrovini. V parenhimskih trakovih najdemo mašcobe. Epitelne celice pa izločajo smolo, s čimer oskrbujejo smolne kanale in travmatske kanale. Fenolne substance so lahko strupene za bakterije, glice in insekte. Druge ekstraktivne snovi pa lahko dajejo vonj in barvo.

Ekstraktivne snovi so:

- rezervna hrana (mašcobe, škrob, maščobne kisline),
- zaščitne snovi (terpeni, smolne kisline),
- rastlinski hormoni (fitosteroli).

Ekstraktivne snovi lesa delimo v tri skupine:

- terpeni in terpenoidi,
- alifatske spojine (mašcobe in voski),
- fenolne snovi.

### 2.2.1 Ekstraktivne snovi, topne v nepolarnih topilih

Nepolarne snovi v lesu so: mašcobe, maščobne kisline, smolne kisline, terpenoidi, voski, steroli, sterolni estri in glikozidi (Zule in sod., 2011). Nepolarna topila so cikloheksan, heksan. Ekstraktivne snovi, ki so topne v nepolarnih topilih imenujemo tudi lipofilni ekstraktivi.

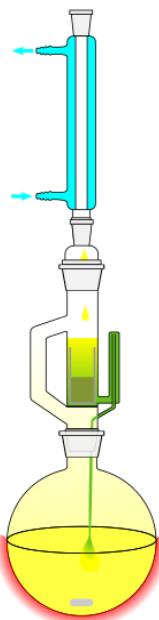
### 2.2.2 Ekstraktivne snovi, topne v polarnih topilih

Polarne snovi v lesu so: enostavni fenoli- stilbeni, flavonoidi, lignani; višji fenoli - tanini, oligolignani (Zule in sod., 2011). Polarna topila so voda, acetona. Ekstraktivne snovi, ki so topne v polarnih topilih, imenujemo tudi hidrofilni ekstraktivi.

## 2.3 EKSTRAKCIJA

### 2.3.1 Soxhletova ekstrakcija

Ekstrakcijsko napravo, ki se imenuje Soxhletov ekstraktor, je leta 1879 izumil Franz von Soxhlet (Soxhlet extractor, 2012). Zasnovan je bil za ekstrakcijo lipidov iz trdega materiala. Vendar Soxhletov aparatom ni omejen samo na ekstrakcijo lipidov. Ekstrahirata se lahko vse snovi, ki so prisotne v ekstrahiranem vzorcu in so topne v topilu, ki ga uporabljamo pri ekstrakciji. Topne snovi topilo izluži, netopne pa ostanejo v vzorcu, v tulcu. Ekstrakcijski aparatom Soxhlet je sestavljen iz bučke, v kateri je topilo, Soxhletovega nastavka, ki ga pritrdimo na bučko in vodnega hladilnika (Slika 1). V Soxhletov nastavek damo tulec z vzorcem. Topilo segrevamo s pomočjo električnih grelcev, kateri so nastavljeni na želeno temperaturo. Hlapa topila potujejo po aparatu navzgor. Ko prispejo do hladilnika, se kondenzirajo in kapljajo na tulec z vzorcem. Hladilnik je hlajen s hladno vodo. Ko kondenzat doseže višino sifona, se komora, v kateri je tulec, samodejno izprazni. Kondenzat steče nazaj v bučko. To je en cikel, cikli se nato ponavljajo. V vsakem ciklu se del topnih snovi izloči iz vzorca.



Slika 1: Soxhletov ekstraktor (Soxhlet extractor, 2012)

## 2.4 TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA

Povzeto po Prošek in Pukl (1991). Tankoplastna kromatografija je planarna separacijska tehnika. Komponente se ločujejo med potovanjem mobilne faze po tanki plasti sorbenta. Sorbent je običajno nanesen na steklene, aluminijaste plošče ali plastične folije. TLC (Thin Layer Chromatography) je odprt sistem, zato je pomembna tudi plinska faza, ki se ustvari v kromatografski kadi. Lastnosti topila se med potovanjem po sorbentu spreminja, zaradi tega nastajajo v plasti gradienti. S tem dosežemo, da se snovi v vzorcu separirajo. Dobljeni rezultati so odvisni od trenutnih fizikalnih pogojev na plošči, zato tankoplastna kromatografija potrebuje več ponovitev, ker je naključna napaka večja od sistemsko.

Velikost plošče TLC je 10 cm x 20 cm ali 20 cm x 20 cm. Debelina sorbenta je običajno 0,20 mm ali 0,25 mm, velikost delcev pa 12 µm.

Vzorce na ploščo lahko nanašamo v točko ali v črto, odvisno od števila vzorcev. Vzorce na ploščo nanašamo v razdalji 10 mm do 20 mm. Nanašamo jih s pomočjo steklene kapilare. V točko se nanese 0,2 µl do 10 µl vzorca. Od spodnjega roba plošče so vzorci pri nanosu oddaljeni 10 mm do 20 mm. Razvijanje kromatograma poteka v posebnih kromatografskih kadeh. Na dno kadi nalijemo razvijalec, ki ga mora biti toliko, da je TLC plošča potopljena vanj okoli 0,5 cm globoko. Ploščo se postavi v kad in mobilna faza začne potovati po plošči navzgor. S seboj nosi tudi molekule komponent vzorca. Med potovanjem prihaja do različnih interakcij, zato se komponente v vzorcu ločijo. Ko mobilna faza prispe do zgornje meje plošče, jo vzamemo iz kadi in posušimo. V kadi je prisotna tudi plinska faza, ki jo povzroča izparevanje mobilne faze s plošče. Vse ločene spojine ne absorbirajo svetlobe v vidnem ali UV območju. S primernim reagentom se lahko plošče orosi, s tem povečamo vidno polje vzorcev.

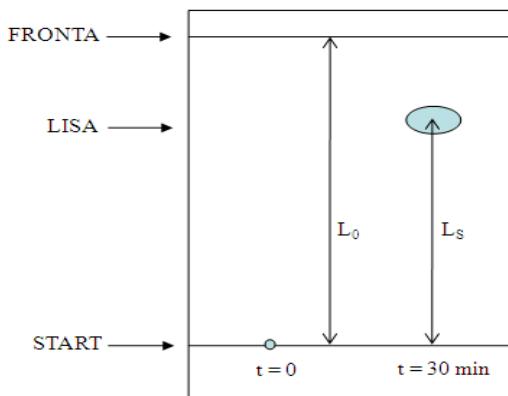
Na sliki 2 je prikazana shema kromatograma. Na točko start nanesemo vzorec. Mobilna faza potuje do zgornje točke, ki jo imenujemo fronta. Med startom in fronto se na različnih mestih nahajajo ločene komponente, ki se kažejo v obliki različno obarvanih lis. Lisam določimo težišče. Izmerimo dolžino od starta do težišča lise, to potem delimo z dolžino potovanja mobilne faze. Dobljen rezultat predstavlja zadrževalni faktor.

Formula za izračun zadrževalnega faktorja:

$$R_f = L_s / L_0 \quad \dots(1)$$

$L_s$  – razdalja od starta do sredine kromatografske lise

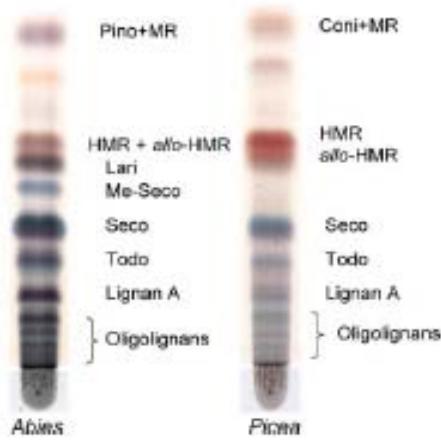
$L_0$  – razdalja potovanja mobilne faze



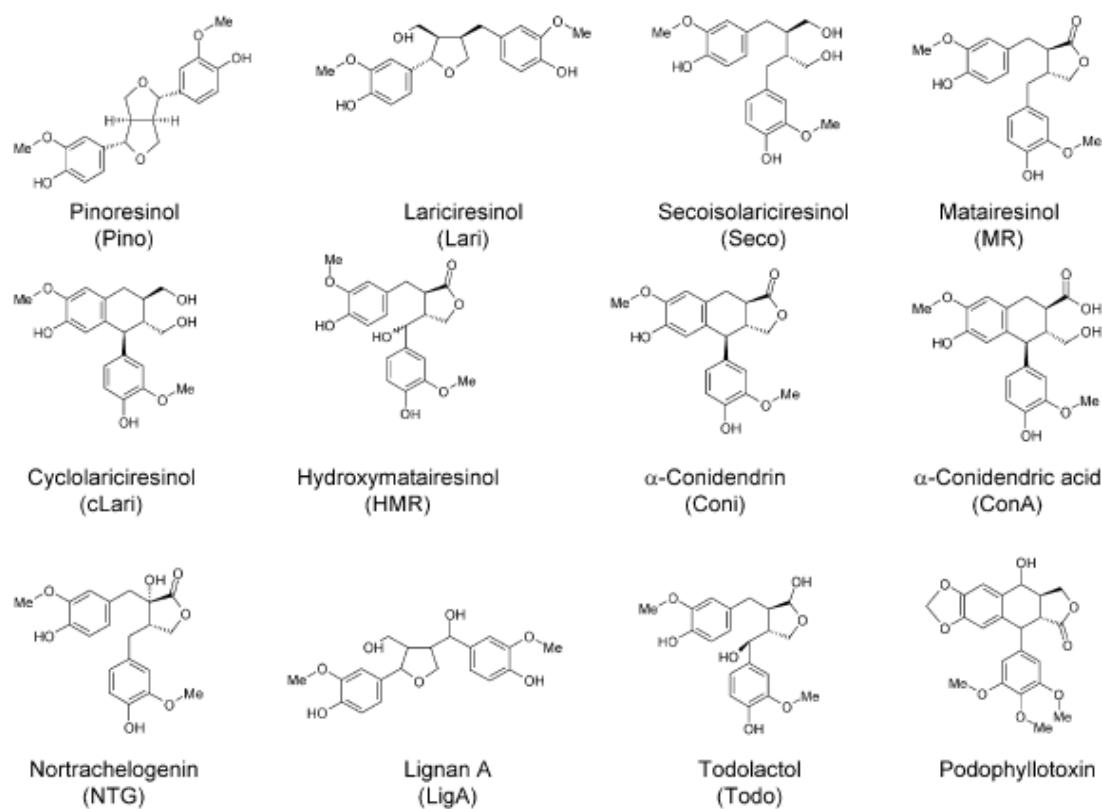
Slika 2: Skica plošče TLC s prikazom, kje nanesemo vzorec, do kam potuje mobilna faza, kje nastajajo lise na kromatogramu (Poljanšek s sod., 2011)

#### 2.4.1 Ločba lignanov jelke s TLC

Na sliki 3 sta predstavljena kromatograma jelke in smreke, ki so ju orosili z žveplovo kislino v etanolu. Na kromatogramu so označene spojine. Vsaka spojina z reagentom tvori svoj barvni odtenek. Na osnovi primerjave kromatogramov na sliki 3 s kromatogrami, ki smo jih pridobili v naši raziskavi, smo določili spojine tudi v ekstraktih proučevane jelovine. Na sliki 4 so predstavljene sheme organskih spojin, ki jih vsebuje les jelke (Willför in sod., 2006)



Slika 3: Kromatogram jelke in smreke (Willför in sod., 2006)



Slika 4: Shema organskih spojin, ki jih vsebuje les jelke (Willför in sod., 2006)

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Vzorci lesa

V raziskavo smo vključili grče, ki so nam jih dostavili iz podjetja TIP, Otiški vrh. Vzorce lesa je pripravil kolega Boštjan Sinkar (Sinkar, 2011). Nato smo vse vzorce grč in lesa zmleli z mlinom. Mlin je imel sito z luknjicami velikosti 0,5 mm.

##### 3.1.2 Kemikalije

V preglednici 1 so prikazane kemikalije, ki smo jih potrebovali pri našem eksperimentu.

Preglednica 1: Seznam uporabljenih kemikalij, ki smo jih uporabljali za naš poizkus (Sigma-Aldrich, 2012)

Kemikalija	Formula	Molska masa (g/mol)	Tališče (°C)	Vrelišče (°C)
Cikloheksan	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>	86,16	4	80,7
Aceton	CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>	58,08	-94	56
Destilirana voda	H <sub>2</sub> O	18,02	0	100
Žveplova kislina	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	98,09	10,4	338
Diklorometan	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	84,93	-95,1	40
Etanol	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	46,07	-114	78

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Določanje suhe snovi

Suhu snov smo določili z gravimetrično metodo. Tehtali smo s tehnicco Mettler Toledo XS. Tehnica je natančna na štiri decimalna mesta. Najprej smo stehtali tehtice in na njih zapisali maso. V vsak tehtič smo nato natehtali približno 1 gram vzorca. Vzorce smo nato postavili za 24 ur v sušilnik. Sušili smo jih na temperaturi 105 °C. Po 24 urah smo vzorce vzeli iz sušilnika jih ohladili v eksikatorju in jih stehtali. Iz teh podatkov smo lahko izračunali delež suhe snovi v vzorcu (glej poglavje 3.2.4.).

#### 3.2.1.1 Suhi ostanek

V vzorcih ekstrakta smo po končani ekstrakciji določili delež suhe snovi. To smo naredili tako, da smo iz bučke vzeli 10 ml vzorca ga dali na petrijevko, ter stehtali. To smo dali v sušilnik na 105 °C za 24 ur. Po končanem sušenju smo ponovno stehtali. Iz dobljenih podatkov smo po formuli izračunali suho snov. Suho snov smo računali po ekstrakciji s cikloheksanom in po ekstrakciji z mešanico acetona in vode.

### 3.2.2 Soxhletova ekstrakcija lesa jelke

V laboratoriju smo imeli na voljo grelni aparat, ki je omogočal ogrevanje 12 Soxhletovih aparatorov hkrati. Za prvo ekstrakcijo smo uporabili cikloheksan. To je nepolarno topilo z značilnim vonjem ter brez barve. Za drugo ekstrakcijo smo uporabili mešanico acetona ter vode (v volumskem razmerju 95:5). Šest izbranih vzorcev smo ekstrahirali samo v mešanici acetona in vode, brez predhodne ekstrakcije s cikloheksanom in sicer z namenom primerjave z acetonskim ekstraktom s predhodno cikloheksansko ekstrakcijo.

Za ekstrakcijo smo uporabili celulozne tulce. V tulce smo vstavili vato, s katero smo zaprli odprtino v tulcu. Tulce smo posušili v sušilniku na temperaturi 105 °C za 24 ur. Vzeli smo jih iz sušilnika in jih dali v eksikator, da so se ohladili. Tulce smo nato stehtali z laboratorijsko tehnicco na 4 decimalna mesta. Tulce smo pobirali posamezno iz eksikatorja, jih stehtali ter postavili nazaj v eksikator. To pa zato, ker so tulci hitro začeli sprejemati vlago iz okolice.

Pripravili smo si vzorce ter kose papirja. Papir smo postavili na tehnicco in pritisnili taro. Na papir smo natresli 2,5 g vzorca. Vzorec smo stresli v tulec in dobro pokrili z vato. Morali smo biti dovolj natančni, da smo ves prah, ki je ostal na papirju, spravili v tulec. Na tulce smo napisali tudi številko vzorca, da jih ne bi pomešali.

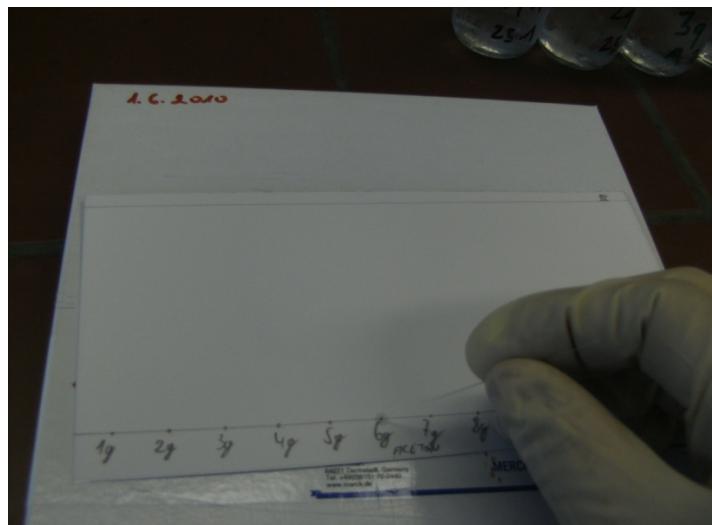
Vsak vzorec smo ekstrahirali dvakrat, najprej s ciklohesanom, nato pa še z mešanico acetona in vode. Za prvo ekstrakcijo smo v bučke nalili 250 ml cikloheksana. Dodali smo po 3 vrelne kamenčke v vsako bučko. V Soxhletov nastavek smo vstavili tulce z vzorcem. Nato smo sestavili aparaturo (Slika 5). Temperatura ekstrakcije je bila nastavljena na 135 °C. Ekstrakcija je potekala 24 ur. Po ekstrakciji smo iz bučk vzeli vzorce. Iz vsake bučke smo vzeli po 50 ml vzorca ekstrakta. Spravili smo jih v zamrzovalnik. Nato smo pripravili še mešanico acetona in vode. Sledila je ekstrakcija. Temperatura ekstrakcije je bila 110 °C. Ekstrakcija je potekala 24 ur. Po končani ekstrakciji smo vzeli 50 ml vzorca in ga dali v zamrzovalnik. Ostanek topila pri obeh ekstrakcijah smo zavrgli med odpadna topila.



Slika 5: Sestavljanje Soxhletovega aparata

### 3.2.3 Tankoplastna kromatografija ekstraktov jelke

Vzorce ekstrakta smo nanesli na ploščo TLC, Silica gel 60 F<sub>254</sub>, velikosti 20 cm x 20 cm. Na sliki 6 je prikazano, kako smo s stekleno kapilaro nanesli 12 vzorcev na ploščo TLC. Ploščo TLC smo spodaj in zgoraj označili pred nanašanjem vzorcev. Spodnja črta pomeni, kje smo nanesli vzorce, zgornja pa do kam bo potovala mobilna faza. Za mobilno fazo smo uporabili zmes diklorometana in etanola v volumskem razmerju 93:7. Na sliki 7 je prikazana kromatografska kad, v katero smo 5 mm visoko nalili mobilno fazo. Nato smo jo pokrili s pokrovom, da se je ustvarila primerna klima. Ploščo TLC smo postavili v kromatografsko kad, največ po dve plošči hkrati. Potovanje mobilne faze po plošči TLC se dobro vidi. Ko je prispela do zgornje črte smo plošče TLC vzeli iz kadi in jih posušili. Po sušenju smo pregledali, če je vidnih kaj lis pod vidnim oziroma pod UV spektrom svetlobe. Nato smo plošče orosili z reagentom (slika 8), ki je bil H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> v etanolu. Volumsko razmerje med H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in etanolom je bilo 50:50. Plošče TLC smo nato postavili v sušilnik za 2 minuti na 105 °C. Po končanem sušenju so se na ploščah TLC pokazale lise. Iz le-teh smo izračunali zadrževalni faktor. Iz barve lis in slik iz literature (Willför in sod., 2006) smo določili organske snovi, ki so v ekstraktu.



Slika 6: Nanašanje ekstrakta s stekleno kapilare



Slika 7: Kromatografska kad



Slika 8: Nanašanje reagenta za vizualizacijo na kromatografsko ploščo

### 3.2.4 Izračuni

1. Zadrževalni faktor

$$R_f = L_s / L_0 \quad \dots(1)$$

Kjer je:  $L_s$  - razdalja od starta do sredine kromatografske lise [mm]

$L_0$  - razdalja potovanja mobilne faze [mm]

2. Delež suhe snovi

$$\text{Delež suhe snovi (s.s.)} = m_0 [\text{g}] / m_{vl} [\text{g}] \quad \dots(2)$$

Kjer je:  $m_0$  - masa absolutno suhega lesa [g]

$m_{vl}$  - masa vlažnega lesa [g]

3. Suhi ostanek.

$$\text{Delež ekstrahiranih snovi v cikloheksanu} = m_{soe} / m_e \quad \dots(3)$$

Kjer je:  $m_{soe}$  – masa suhega ostanka ekstrakta [g]

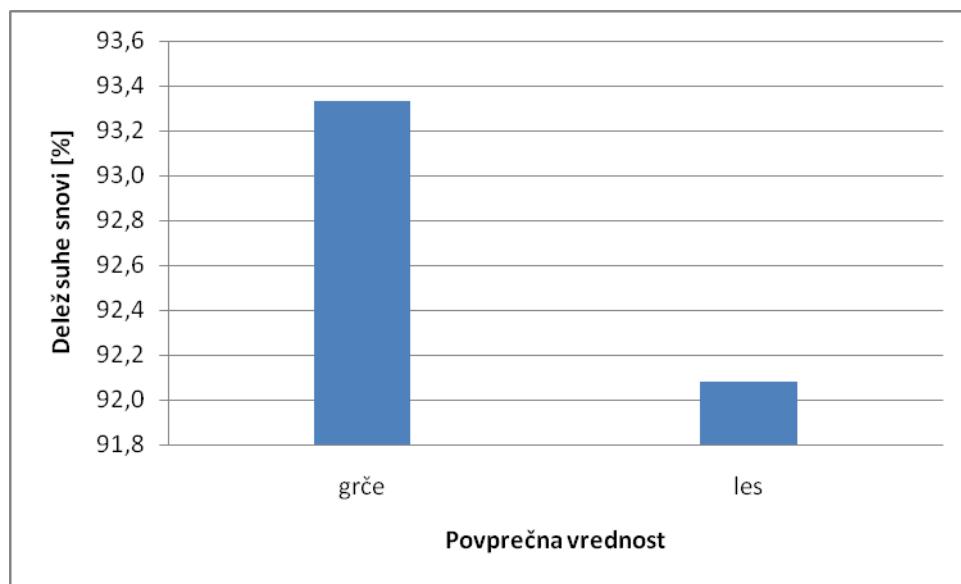
$m_e$  – masa ekstrakta [g]

Enako formulo smo uporabili tudi za izračun deleža ekstrahiranih snovi v acetonu.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 SUHA SNOV

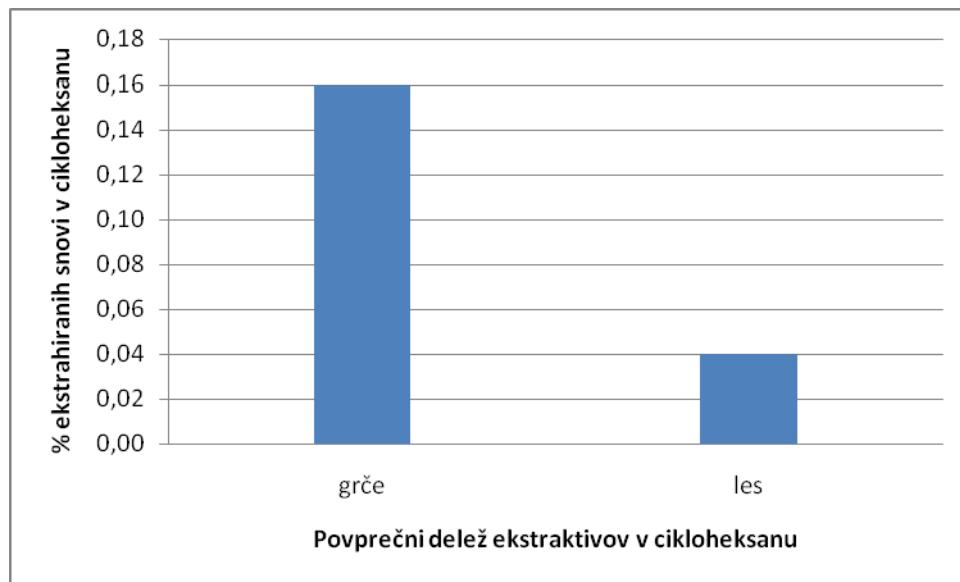
Vse podatke za suho snov sem povzel iz diplome Sinkar (2011). Na sliki 8 sta grafično prikazana povprečna delež suhe snovi lesa in grč. Povprečni delež suhe snovi v lesu je 92,08%, v grčah pa 93,33%. Večji delež suhe snovi v grčah je posledica večje gostote grč.



Slika 9: Grafični prikaz povprečne vrednosti suhe snovi (Sinkar, 2011)

#### 4.2 DELEŽ EKSTRAHIRANIH SNOVI V CIKLOHEKSANU

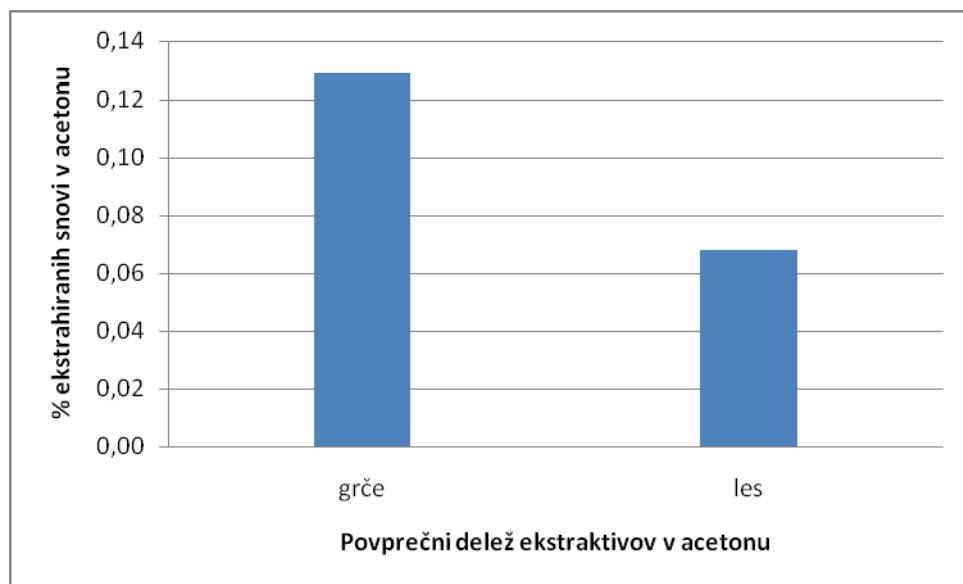
Delež ekstraktov smo določili z gravimetrično metodo. To delo je bilo zelo težko, saj je moralo potekati zelo hitro, ker je topilo hitro izparevalo. Iz tega lahko sklepamo, da je eksperimentalna napaka velika. Podatki za delež ekstraktov v cikloheksanu so navedeni v diplomi Sinkar (2011). Na sliki 10 sta grafično prikazana povprečna deleža ekstraktivov v cikloheksanu. Povprečni delež ekstraktivov v grčah je 0,16% v lesu pa 0,04%.



Slika 10: Grafični prikaz povprečnih deležev ekstraktivov v cikloheksanu (Sinkar, 2011).

#### 4.3 DELEŽ EKSTRAHIRANIH SNOVI V ACETONU

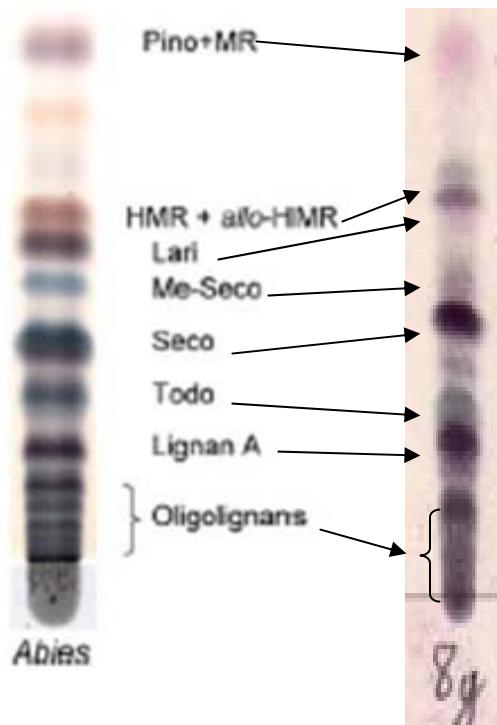
Podatki za delež ekstrahiranih snovi so navedeni v diplomi Sinkar (2011). Na sliki 11 sta grafično prikazani povprečni vrednosti ekstraktivov v acetonu. Povprečni delež ekstraktivov v grčah je 0,13% v lesu pa 0,07%. Grče vsebujejo več ekstraktivnih spojin kakor les.



Slika 11: Grafični prikaz povprečnih vrednosti deleža ekstraktivov v acetonu (Sinkar, 2011)

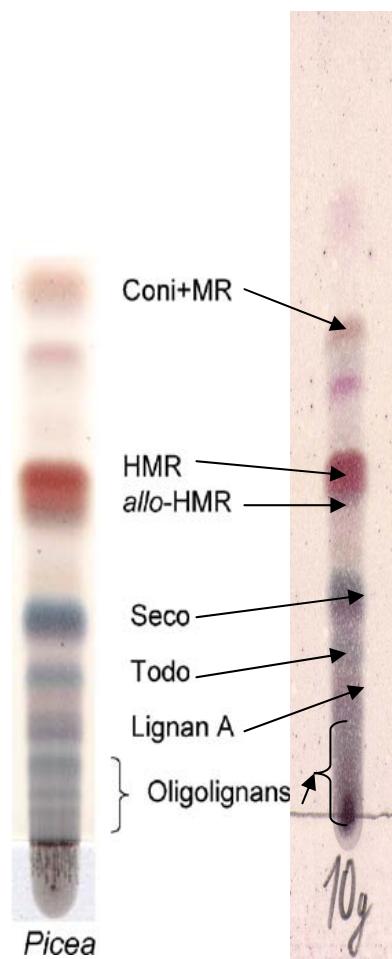
#### 4.4 ANALIZA EKSTRAKTIVOV JELKE S TANKOPLASTNO KROMATOGRAFIJO

Iz razvitih plošč TLC smo za nekatere organske spojine določili zadrževalni faktor. Lisam smo določili težišče, to je na sredini lise. S pomočjo te označbe na lisi smo izračunali zadrževalni faktor. Za naš eksperiment je bil najpomembnejši acetonski ekstrakt. Na kromatografskih ploščah z acetonskim ekstraktom so se lepo razvile lise. Lise na kromatografski plošči smo identificirali s pomočjo slike iz literature (Willför in sod., 2006). Na sliki 12 imamo predstavljeno primerjavo dveh kromatogramov, na levi je kromatogram podan v literaturi (Willför in sod., 2006), na desni strani pa je kromatogram našega vzorca jelke grče.



Slika 12: Primerjava kromatograma jelke iz članka (Willför in sod., 2006) z našim kromatogramom. Legenda: Pino + MR: pinorezinol + matarezinol, HMR + allo – HMR: hidroksimatarezinol + allo – hidroksimatarezinol, Lari: laricirezinol, Me – Seco: Me – secoizolaricirezinol, Seco: secoizolaricirezinol, Todo: todolaktol, Lignan A: lignan A, Oligolignans: oligolignani.

Če podrobno pogledamo kromatograme TLC, vidimo, da sta prisotna dva tipa kromatogramov. Prvega smo pripisali lesu in grčam jelke, drugega pa lesu in grčam smreke.



Slika 13: Primerjava kromatograma smreke iz članka (Willför in sod., 2006) z našim kromatogramom. Legenda: Coni + MR: + matairezinol, HMR: hidroksimatairezinol, allo-HMR: allo-hidroksimatairezinol, Seco: secoizolaricirezinol, Todo: todolaktol, Lignan A: lignan A, Oligolignans: oligolignani.

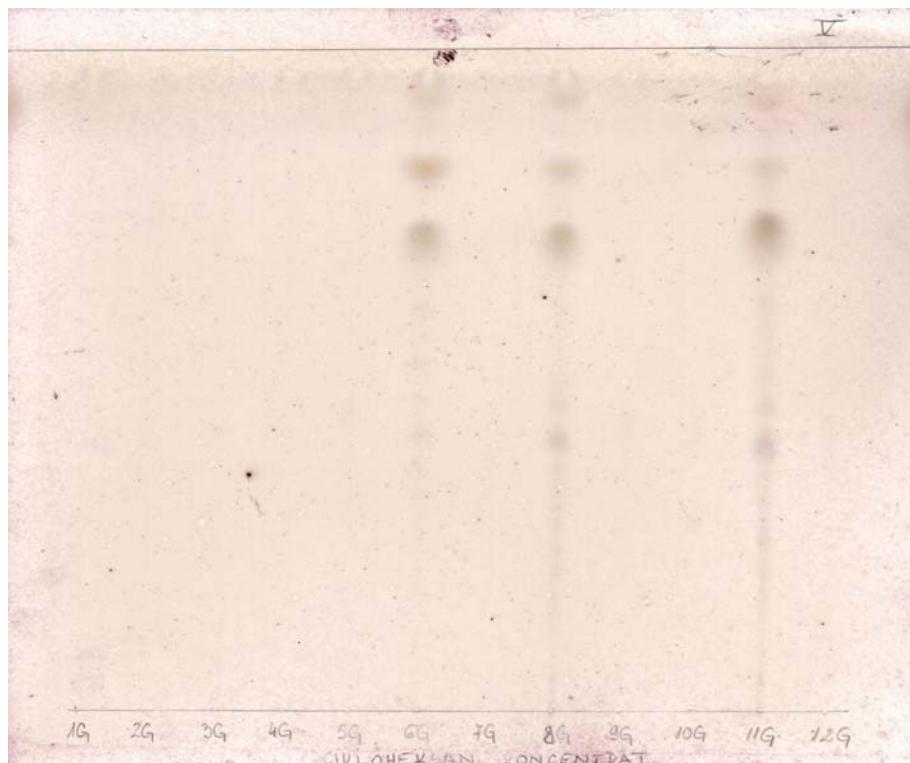
Iz tega sklepamo, da vzorci, ki smo jih pridobili od dobavitelja, niso bili samo vzorci lesa jelke, temveč tudi smreke. Kromatografija TLC se je izkazala tudi kot primerna metoda za določitev vrste lesa oziroma grč.

#### 4.4.1 Tankoplastna kromatografija cikloheksanskih ekstraktov

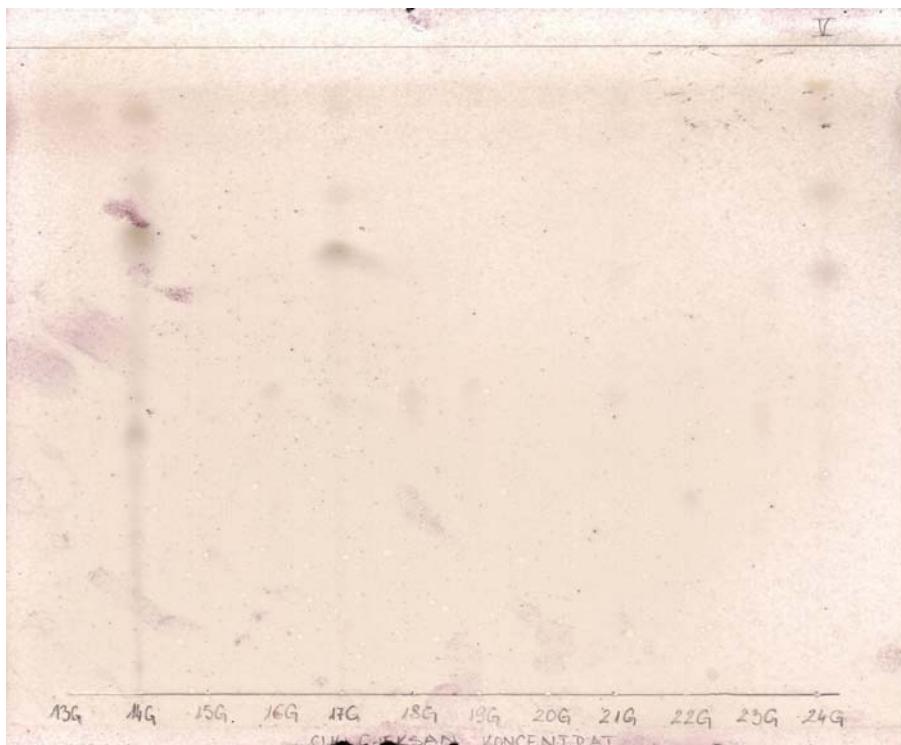
V preglednici 2 so prikazani zadrževalni faktorji organskih spojin grč in lesa jelke, ki so prisotne v nepolarnem topilu. Na slikah 14, 15 in 16 so predstavljeni kromatogrami s cikloheksanskega ekstrakta jelke. Za mobilno fazo smo uporabili zmes diklorometana in etanola v volumskem razmerju 93:7. Lise smo vizualizirali s  $H_2SO_4$ :etanol (volumsko razmerje 50:50). Na kromatogramu je vidnih zelo malo lis. Mogoče bi z drugimi reagenti uspeli detektirati več lis. Žal nam ni uspelo določiti, kateri organski snovi pripadajo lise. Predvidevamo, da lise pripadajo maščobam ali maščobnim kislinam, ki so v lesu.

Preglednica 2: Zadrževalni faktorji, pridobljeni iz cikloheksanskega ekstrakta

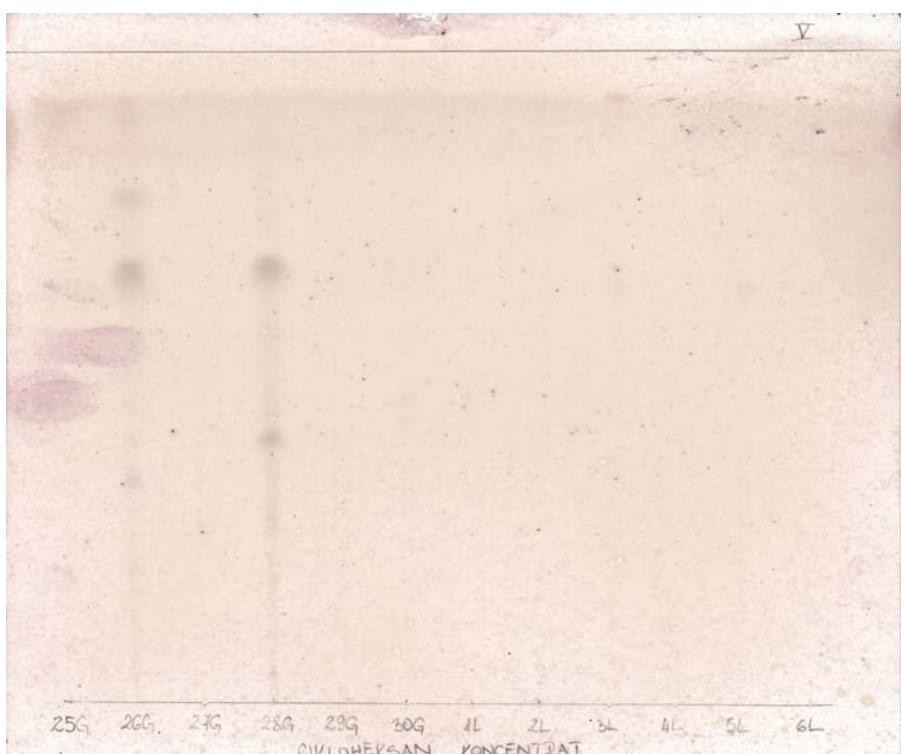
Vzorec	6 grča	8 grča	11 grča	14 grča	17 grča	24 grča	26 grča	28 grča
Spojina	Zadrževalni faktor							
			0,42	0,41			0,34	0,41
	0,72	0,72	0,75	0,71	0,68	0,67	0,67	0,67
	0,82	0,82				0,79	0,77	
	0,95		0,93	0,92		0,94		



Slika 14: Kromatogram, opravljen s cikloheksanskim ekstraktom za vzorce od 1 do 12 grča



Slika 15: Kromatogram, opravljen s cikloheksanskim ekstraktom za vzorce od 13 do 24 grča



Slika 16: Kromatogram, opravljen s cikloheksanskim ekstraktom za vzorce od 25 do 30 grča in 1 do 6 les

#### 4.4.2 Tankoplastna kromatografija acetonskih ekstraktov

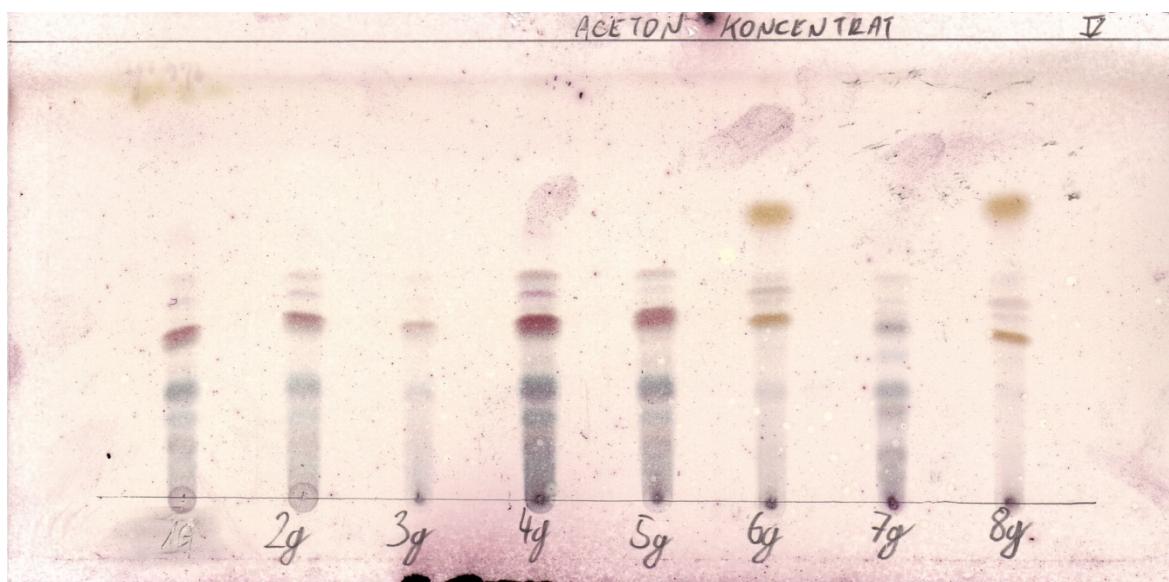
Na slikah 17, 18, 19 in 20 so kromatogrami acetonskega ekstrakta jelke. Kromatogrami so bili pripravljeni iz acetonskih ekstraktov vzorcev, ki so bili predhodno ekstrahirani s cikloheksanom. Za mobilno fazo smo uporabili zmes diklorometana in etanola, v volumskem razmerju 93:7. Za reagent smo uporabili zmes  $H_2SO_4$ :etanol (volumsko razmerje 50:50). Na kromatogramih je vidnih več organskih spojin. Ugotovili smo, da je bila izbira mobilne faze in reagenta pravilna. V preglednicah 3, 4, 5 in 6 so prikazani zadrževalni faktorji organskih spojin, ki so bile prisotne v acetonskem ekstraktu.

Preglednica 3: Zadrževalni faktorji, pridobljeni iz acetonskega ekstrakta. Legenda: HMR + allo – HMR: hidroksimatairezinol + allo – hidroksimatairezinol, Lari: laricirezinol, Seco: secoizolaricirezinol, Todo: todolaktol, Lignan A: lignan A, Oligolignans: oligolignani

Vzorec	1 grča	2 grča	3 grča*	4 grča	5 grča	6 grča**	7 grča	8 grča**	Barva
Ime spojine	Zadrževalni faktor								
Oligolignans	0,11						0,11		Siva
Lignan A	0,17				0,19		0,20		Sivo modra
Todo	0,25	0,25	0,23	0,25	0,25	0,24	0,25		Sivo zelena
							0,32		
Seco	0,36	0,39	0,38	0,39		0,40	0,38	0,36	Vijolična
					0,41			0,43	Rdeče rjava
Lari		0,44		0,45		0,45			Vijolična
HMR + allo - HMR				0,50	0,50		0,50		Roza
						0,64		0,66	Oker

\* predvidevamo, da je to vzorec lesa jelke

\*\* predvidevamo, da je to vzorec lesa smreke



Slika 17: Kromatogram, pridobljen z acetonskim ekstraktom za vzorce od 1 do 8 grča

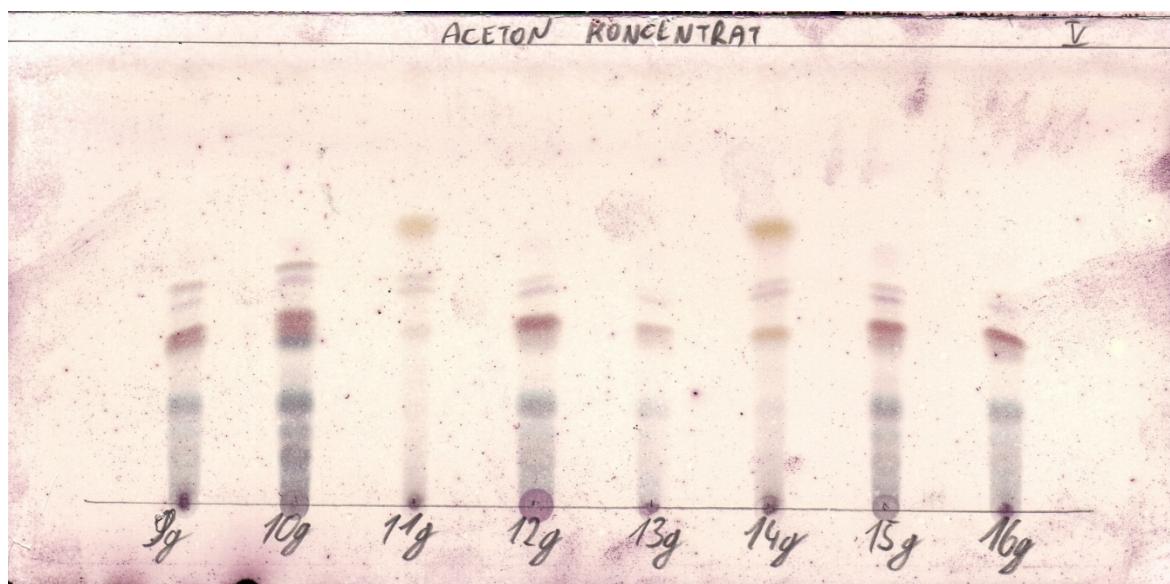
Samo nekaj vzorcev je pripadal lesu oziroma grčam jelke, v večini pa so bili to vzorci lesa in grč smreke.

Preglednica 4: Zadrževalni faktorji, pridobljeni iz acetonskega ekstrakta. Legenda: HMR + allo – HMR: hidroksimatairezinol + allo –hidroksimatairezinol, Lari: laricirezinol, Seco: secoizolaricirezinol, Todo: todolaktol, Lignan A: lignan A, Oligolignans: oligolignani

Vzorec	9 grča	10 grča	11 grča*	12 grča	13 grča**	14 grča*	15 grča	16 grča	Barva
Ime spojine	Zadrževalni faktor								
Oligolignans		0,11							Siva
Lignan A		0,16		0,17					Sivo modra
Todo	0,21	0,23		0,22	0,21		0,22	0,21	Sivo zelena
	0,36	0,35							Vijolična
Seco	0,42	0,40		0,40	0,39	0,38	0,39	0,38	Rdeče rjava
Lari	0,46	0,48	0,46		0,45	0,46	0,45		Vijolična
HMR + allo - HMR		0,51	0,50			0,50	0,48		Roza
			0,64			0,62			oker

\* predvidevamo, da gre za vzorec lesa smreke.

\*\* predvidevamo, da gre za vzorec lesa jelke.



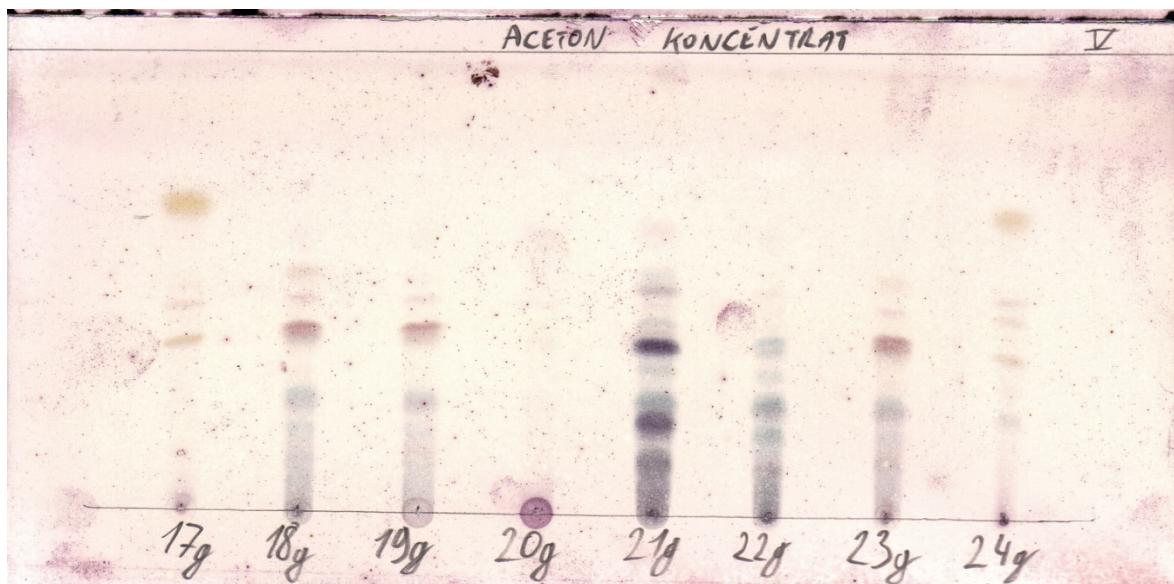
Slika 18: Kromatogram, pridobljen z acetonskim ekstraktom za vzorce od 9 do 16 grča

Preglednica 5: Zadrževalni faktorji, pridobljeni iz acetonskega ekstrakta. Legenda: Lari: laricirezinol, Seco: secoizolaricirezinol, Todo: todolaktol, Lignan A: lignan A, Oligolignans: oligolignani

Vzorec	17 grča*	18 grča	19 grča	20 grča**	21 grča	22 grča	23 grča	24 grča*	Barva
Ime spojine	Zadrževalni faktor								
Oligolignans				0,13	0,10				Siva
Lignan A					0,17				Sivo modra
				0,21		0,23	0,22		Sivo modra
Todo		0,25	0,25		0,25	0,25			Sivo zelena
								0,29	
Seco	0,36	0,39	0,39		0,38	0,37	0,38	0,38	Rdeče rjava
Lari					0,49			0,48	Vijolična
		0,63						0,65	Oker

\* predvidevamo, da gre za vzorec lesa smreke.

\*\* predvidevamo, da gre za vzorec lesa z izjemno malo ekstraktivnimi snovmi.



Slika 19: Kromatogram, pridobljen z acetonskim ekstraktom za vzorce od 17 do 24 grča

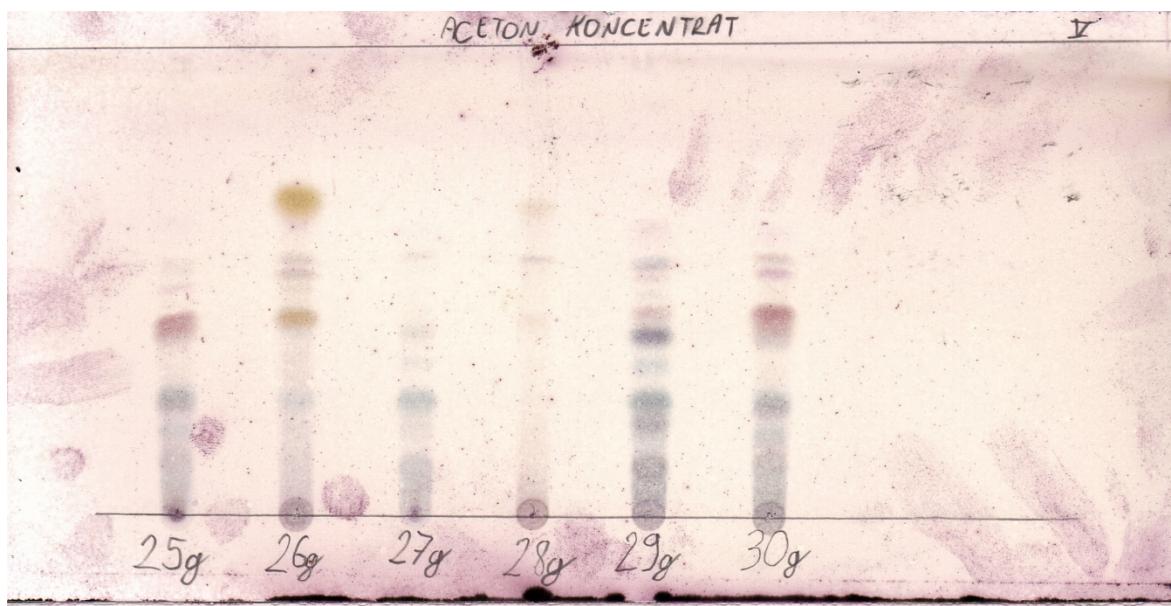
Preglednica 6: Zadrževalni faktorji, pridobljeni iz acetonskega ekstrakta. Legenda: HMR + allo – HMR: hidroksimatairezinol + allo –hidroksimatairezinol, Lari: laricirezinol, Seco: secoizolaricirezinol, Todo: todolaktol, Lignan A: lignan A, Oligolignans: oligolignani

Vzorec	25 grča	26 grča*	27 grča**	28 grča***	29 grča	30 grča	Barva
Ime spojine	Zadrževalni faktor						
Oligolignans					0,05		Siva
					0,11	0,11	Siva
Lignan A						0,17	Vijolična
					0,19		Vijolična
Todo	0,24	0,25	0,25		0,25	0,25	Modra
			0,32		0,32		Vijolična
Seco	0,40	0,41	0,39		0,38	0,37	Roza
					0,43	0,43	
Lari		0,50				0,47	Roza
HMR + allo - HMR		0,54		0,54	0,54	0,54	Vijolična
		0,68					Oker

\* predviedevamo, da gre za vzorec lesa smreke.

\*\* predviedevamo, da gre za vzorec lesa jelke.

\*\*\* nizka koncentracija ekstrakta.



Slika 20: Kromatogram pridobljen z acetonskim ekstraktom za vzorce od 25 do 30 grča

#### 4.4.2.1 Tankoplastna kromatografija acetonskih ekstraktov brez predhodne cikloheksanske ekstrakcije

Izbrane vzorce grč jelke smo ekstrahirali v mešanici acetona in vode, brez predhodne ekstrakcije s cikloheksanom. Iz primerjave kromatogramov acetonskih ekstraktov, kjer smo predhodno naredili cikloheksansko ekstrakcijo in acetonskih kromatogramov brez cikloheksanske ekstrakcije, vidimo, da imajo kromatogrami brez predhodne cikloheksanske ekstrakcije več lis na kromatogramu. Na sliki 21 je prikazan kromatogram vzorcev, ki so bili pripravljeni brez predhodne ekstrakcije s cikloheksanom. Sklepamo, da se je manjši delež nepolarnih ekstraktov ekstrahiral tudi z acetonom. V preglednicah 7 in 8 so podani zadrževalni faktorji.

Preglednica 7: Zadrževalni faktorji, pridobljeni iz acetonskega ekstrakta, brez predhodne ekstrakcije v cikloheksanu. Legenda: Pino + MR: pinorezinol + matarezinol, HMR + allo – HMR: hidroksimatarezinol + allo – hidroksimatarezinol, Lari: laricirezinol, Me – Seco: Me – secoizolaricirezinol, Seco: secoizolaricirezinol, Todo: todolaktol, Lignan A: lignan A, Oligolignans: oligolignani

Vzorec	1` grča*	2` grča*	3` grča**	4` grča*	5` grča	6` grča*	Barva
Ime spojine	Zadrževalni faktor						
Oligolignans				0,07	0,08	0,08	Sivkasto črna
				0,10			Črna
				0,12			
Lignan A	0,13			0,13		0,13	Vijolična
Todo	0,15			0,16			Sivo modra
		0,18	0,18			0,17	Vijolična
Seco				0,21	0,20	0,19	Sivo zelena
Me-Seco	0,23		0,24	0,24	0,23		Oranžno rdeča
		0,27					
Lari	0,29	0,29	0,29		0,29	0,29	Rjava
		0,34		0,32	0,31	0,31	Vijolična
			0,37	0,37	0,38		Rjava
HMR+allo-HMR	0,40		0,39		0,39		Roza
					0,42	0,41	Rjava
			0,47				Temno rdeča
Pino+MR					0,54	0,52	Rjava
			0,59				Oker
			0,93				Rjava

\*predvidevamo, da gre za vzorec lesa smreke.

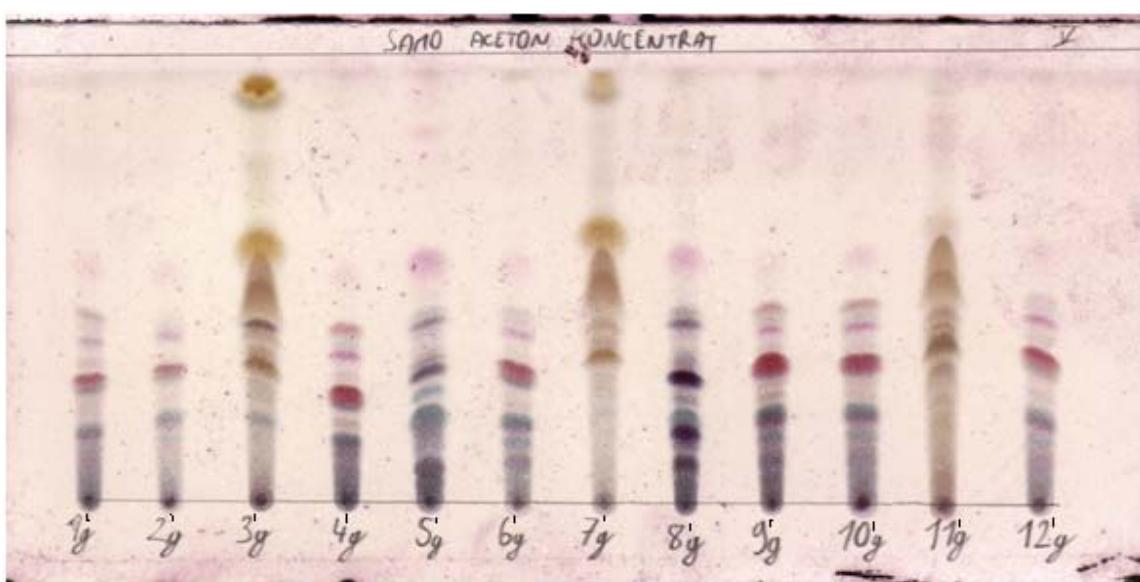
\*\*predvidevamo, da gre za vzorce lesa smreke.

Preglednica 8: Zadrževalni faktorji, pridobljeni iz acetonskega ekstrakta, brez predhodne ekstrakcije v cikloheksanu. Legenda: Pino + MR: pinorezinol + matarezinol, HMR + allo – HMR: hidroksimatarezinol + allo – hidroksimatarezinol, Lari: laricirezinol, Me – Seco: Me – secoizolaricirezinol, Seco: secoizolaricirezinol, Todo: todolaktol, Lignan A: lignan A, Oligolignans: oligolignani

Vzorec	7` grča**	8` grča	9` grča*	10` grča*	11` grča**	12` grča*	Barva
Ime spojine	Zadrževalni faktor						
Oligolignans			0,09				Sivkasto črna
		0,10				0,11	Črna
Lignan A		0,13	0,13				Vijolična
Todo		0,16	0,14	0,15		0,14	Sivo modra
			0,18			0,17	Vijolična
Seco		0,19	0,20	0,21		0,20	Sivo zelena
Me-Seco		0,22	0,23				Oranžno rdeča
Lari		0,28			0,30		Temno siva
	0,32	0,31	0,32	0,32		0,33	Vijolična
	0,35				0,37		Rjava
HMR+allo-HMR	0,39	0,39	0,38	0,38		0,40	Rdeče rjava
					0,43		Rjava
				0,44			Temno rdeča
Pino+MR	0,54	0,55	0,52		0,51		vijolična
	0,62				0,58		Oker
	0,94						Rjava

\*predvidevamo, da gre za vzorec smreke.

\*\*predvidevamo, da gre za vzorce lesa smreke.



Slika 21: Kromatogram, pridobljen z acetonskim ekstraktom, brez predhodne ekstrakcije v cikloheksanu

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

#### 5.1.1 Suha snov

Najprej smo vzorce zmleli v fin prah in določili delež suhe snovi. Grče so vsebovale povprečno 93,33% suhe snovi. Les je vseboval povprečno 92,08% suhe snovi. Grče imajo več suhe snovi, ker imajo večjo gostoto kakor les.

#### 5.1.2 Delež ekstrahiranih snovi v cikloheksanu

Ekstraktivnih snovi v cikloheksanu je bilo v lesu 0,04% v grčah pa 0,16%. V grčah je več ekstraktivnih snovi, ki ščitijo les pred vdorom patogenih mikroorganizmov pri morebitnem odlomu veje. S tem se prepreči okužba živega drevesa. Organske spojine tudi ščitijo les pred napadom škodljivih insektov. V primeru, da les vsebuje premalo organskih spojin, je bolj dovzeten za napad mikroorganizmov.

#### 5.1.3 Delež ekstrahiranih snovi v acetonu

Ekstraktivnih snovi v acetonu je bilo v lesu 0,07 % v grčah pa 0,13%. Esktraktivne snovi lesu omogočijo zaščito pred vdorom patogenih mikroorganizmov pri morebitnem odlomu veje. Organske spojine tudi ščitijo les pred napadom škodljivih insektov, če les vsebuje premalo organskih spojin je bolj dovzeten za napad mikroorganizmov in insektov.

### 5.1.4 TLC

#### 5.1.4.1 TLC s cikloheksanskim ekstraktom

Kromatogrami s cikloheksanskim ekstraktom niso bili osrednji cilj naše raziskave. Pripravili smo jih, da bi videli, koliko organskih spojin se bo ločilo. Vendar spojin nismo znali točno poimenovati. Predvidevamo, da lise na cikloheksanskih kromatogramih pripadajo maščobam in maščobnim kislinam, ki so v lesu. Na kromatogramih s cikloheksanskim ekstraktom so se pojavile 3 lise, vendar ne pri vseh vzorcih. Če bi izbrali drugo mobilno fazo in razvijalec za ta ekstrakt, bi lahko tudi v cikloheksanskem ekstraktu ločili več snovi.

#### 5.1.4.2 TLC z acetonskim ekstraktom

Kromatografija TLC se je izkazala kot primerna metoda za ločevanje lignanov jelke. Mobilna faza je lepo ločila organske spojine, katere smo potem vizualizirali z zmesjo  $H_2SO_4$ /etanol (vol. razmerje 50:50). Lignane na kromatogramih smo identificirali na podlagi podatkov iz literature (Willför in sod., 2006). Vijolična barva predstavlja: pinorezinol; rdeča ali rdečerjava barva: hidroksimatarezinol; temno siva barva: laricirezinol; Modra barva: secoizolaricirezinol, todolaktol (Willför in sod., 2006). Kromatogrami, ki so bili pripravljeni z ekstrakti vzorcev brez predhodne ekstrakcije v cikloheksanu, so pokazali več lis. Iz tega lahko sklepamo, da se je manjši delež nepolarnih snovi ekstrahiral tudi z acetonom.

## 6 SKLEP

V lesu jelke smo našli veliko različnih organskih spojin, ki smo jih identificirali s tankoplastno kromatografijo na podlagi primerjave s podatki v literaturi (Willför in sod., 2006). Identificirali smo naslednje organske spojine: Pino + MR: pinorezinol + matairezinol, HMR + allo – HMR: hidroksimatairezinol + allo – hidroksimatairezinol, Lari: laricirezinol, Me – Seco: Me – secoizolaricirezinol, Seco: secoizolaricirezinol, Todo: todolaktol, Lignan A: lignan A, Oligolignans: oligolignani. Organske spojine v lesu jelke dajejo zaščito pred vdori mikroorganizmov, gliv ter napadi insektov. Iz tega lahko sklepamo, da imajo veje jelke zaradi morebitnega odloma večjo količino organskih spojin kakor les, da se prepreči okužbo zdravega lesa.

## 7 POVZETEK

Cilji diplomskega dela so bili:

- primerno pripraviti grče in les jelke za izračun suhe snovi,
- pripraviti 30 vzorcev grč in 6 vzorcev lesa za ekstrakcijo,
- pripraviti cikloheksanske in acetonske ekstrakte,
- izračunati delež suhe snovi v ekstraktu,
- opraviti tankoplastno kromatografijo,
- izračunati zadrževalne faktorje različnim organskim spojinam, ki so prisotne v ekstraktih.

Uporabili smo 30 vzorcev grč in 6 vzorcev lesa. Od vsakega vzorca smo za tehtali po 1 g. Dali smo jih v sušilnik za 24 ur, jih stehtali in izračunali delež suhe snovi. Pripravili smo celulozne tulce, jih zamašili z vato in dali v sušilnik za 24 ur. Zatehtali smo 2,5 g vzorca lesa jelke in ga dali v celulozne tulce. Ekstrahirali smo 12 vzorcev hkrati. Najprej s cikloheksanom, nato pa še z mešanico acetona in vode. Dobljene ekstrakte smo nalili v stekleničke. Ostanek pa smo zavrgli med odpadna topila. Iz ekstraktov smo nato določili suho snov. Pripravili smo mobilno fazo za tankoplastno kromatografijo, jo nalili v kromatografsko kad in pokrili s pokrovom. Vzorce smo nanesli na plošče TLC. Plošče TLC smo postavili v kromatografsko kad. Po končanem potovanju mobilne faze smo jih posušili. Nato smo jih poškropili z razvijalcem – s  $H_2SO_4$  v etanolu (volumsko razmerje 50:50). Dali smo jih v sušilnik na 105 °C za 2 minuti. S tem smo dobili razvite kromatograme. Iz razvitih kromatogramov smo izračunali zadrževalne faktorje posameznim organskim spojinam. Izračunali smo delež ekstraktivov v cikloheksanu in acetonu.

Povprečna vrednost suhe snovi lesa je 92,08%, lesa grče pa 93,33%.

Povprečni delež ekstraktivov v cikloheksanu je 0,16% v grčah in 0,04% v lesu.

Povprečni delež ekstraktivov v acetonu je 0,13% v grčah in 0,07% v lesu.

Ugotovili smo, da imajo grče veliko več ekstraktivnih snovi kakor pa les. V lesu jelke smo našli veliko različnih organskih spojin, ki smo jih identificirali s tankoplastno kromatografijo na podlagi obstoječe literature (Willför in sod., 2006). Identificirali smo naslednje organske spojine: Pino + MR: pinorezinol + matarezinol, HMR + allo – HMR: hidroksimatarezinol + allo – hidroksimatarezinol, Lari: laricirezinol, Me – Seco: Me – secoizolaricirezinol, Seco: secoizolaricirezinol, Todo: todolaktol, Lignan A: lignan A, Oligolignans: oligolignani. Organske spojine v lesu jelke dajejo zaščito pred vdori mikroorganizmov, gliv ter napadi insektov. Iz tega lahko sklepamo, da imajo veje jelke

zaradi morebitnega odloma večjo količino organskih spojin kakor les, da prepreči okužbo zdravega lesa.

## 8 VIRI

- Čufar K. 2006. Anatomija lesa. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo: 185 str.
- Mlakar J. 1985. Dendrologija : drevesa in grmi Slovenije. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 164 str.
- Poljanšek I., Vek V., Oven P. 2011. Določitev galne kisline, pirokatehola, floroglucinola, resorcinola in katehina s tankoplastno kromatografijo. Zbornik gozdarstva in lesarstva, 95: 3-10
- Prošek M., Pukl M. 1991. Kvantitativna planarna kromatografija. Ljubljana, Kemijski inštitut Boris Kidrič: 5-50
- Sigma-Aldrich. (2012)  
<http://www.sigmaaldrich.com/european-export.html> (8.7.2012)
- Sinkar B. 2011. Vsebnost celokupnih fenolov v jelovih in smrekovih grčah. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo: 57 str.
- Soxhlet ekstraktor. 2012  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Soxhlet\\_extractor](http://en.wikipedia.org/wiki/Soxhlet_extractor) (12.5.2012)
- Tišler V. 1986. Kemija lesa. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo.
- Willför S. M., Smeds A. I., Holmbom B. R. 2006. Chromatographic analysis of lignans. Journal of chromatography A, 1112, 1-2: 64-77
- Zule J., Čufar K., Tišler V. 2011. Ekstraktivi v tkivih evropskega macesna. Zbornik gozdarstva in lesarstva, 5: 170-175

## ZAHVALA

Zahvalil bi se vsem, ki so mi pomagali pri izdelavi diplomskega dela. Zahvalil bi se mentorici doc. dr. Idi Poljanšek za pomoč pri eksperimentalnem in pisnem delu diplomskega dela. Hvala somentorju prof. dr. Primožu Ovnu in recenzentu prof. dr. Marku Petriču. Hvala družini in dekletu za vso podporo pri izdelovanju diplomskega dela.